

09/937521  
PCT/JP00/01802

300/01802

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

24.03.00

4

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 3月26日

REC'D 19 MAY 2000

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第084743号

WIPO

PCT

出願人

Applicant(s):

寶酒造株式会社

PRIORITY

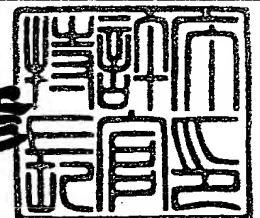
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3030331

【書類名】 特許願

【整理番号】 T-1373

【提出日】 平成11年 3月26日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志殿

【国際特許分類】 C12N 15/12  
C12N 9/80

【発明者】

    【住所又は居所】 福岡県福岡市西区愛宕浜4丁目34番1号

    【氏名】 伊東 信

【特許出願人】

    【識別番号】 591038141

    【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

    【代表者】 大宮 久

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 063223

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 セラミダーゼ遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列、もしくはその一部であって、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子。

【請求項 2】 配列表の配列番号 1 5 に記載の塩基配列、もしくはその一部であって、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする請求項 1 記載の遺伝子。

【請求項 3】 配列表の配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列において、1 個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが導入されたアミノ酸配列からなり、かつ、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子。

【請求項 4】 配列表の配列番号 1 5 に記載の塩基配列において、1 個以上の塩基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが導入された塩基配列からなり、かつ、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子。

【請求項 5】 請求項 2 ～ 4 いずれか 1 項に記載の遺伝子とストリンジェントな条件下においてハイブリダイズすることができ、かつ、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 5 いずれか 1 項に記載の遺伝子を含んでなる組換え DNA。

【請求項 7】 請求項 6 記載の組換え DNA を挿入されてなる、微生物、動物細胞又は植物細胞を宿主細胞とする発現ベクター。

【請求項 8】 請求項 7 記載の発現ベクターを導入されてなる形質転換体。

【請求項 9】 請求項 8 記載の形質転換体を培養し、該培養物よりセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法。

【請求項 1 0】 請求項 1 ～ 5 いずれか 1 項に記載の遺伝子によりコードされる、セラミダーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項 1 1】 請求項 1 ～ 5 いずれか 1 項に記載の遺伝子またはその一部

に相補的なアンチセンスDNA。

【請求項 1 2】 請求項 1 ～ 5 いずれか 1 項に記載の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスRNA。

【請求項 1 3】 請求項 1 1 記載のアンチセンスDNAを挿入されてなる発現ベクター。

【請求項 1 4】 請求項 1 ～ 5 いずれか 1 項に記載の遺伝子に特異的にハイブリダイズする合成オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー。

【請求項 1 5】 請求項 1 0 記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子に関する。さらに詳しくは、生体内のセラミドの調節、ならびにセラミドの代謝異常症の治療等に有用な、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子の塩基配列に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

セラミダーゼはスフィンゴ脂質の一種であるセラミドをスフィンゴイドと脂肪酸に加水分解する酵素である。セラミドがセラミダーゼにより加水分解されて生成するスフィンゴイドはプロテインキナーゼCの阻害、ホスホオリパーゼDの活性化、カルモジュリン依存性の酵素の阻害等の種々の生理活性を有しており、細胞の増殖や細胞内情報伝達に関与する事により、細胞機能の調節に働いていると考えられている重要な物質である。セラミダーゼはこのスフィンゴイド量の調節という重要な役割を担う酵素である。

【0 0 0 3】

セラミダーゼはその至適pHにより酸性セラミダーゼ、中性・アルカリ性セラミダーゼに分類される。これまで酸性域に至適pHを有するセラミダーゼの存在は、ラット脳〔バイオケミストリー (Biochemistry)、第8巻、第1692～1698頁

(1969) ]、モルモット上皮細胞 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、第270巻、第12677~12684頁 (1995) ]、ヒト腎臓 [バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ (Biochim. Biophys. Acta)、第398巻、第125~131頁 (1975) ]、脾臓 [バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ、第1004巻、第245~251頁 (1989) ]、繊維芽細胞 [バイオケミカル・ジャーナル (Biochem. J.)、第205巻、第419~425頁 (1982) ]、上皮 [フェブス・レターズ (FEBS Lett.)、第268巻、第110~112頁 (1990) ] 等の哺乳動物組織、ヒト尿 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第270巻、第11098~11102頁 (1995) ] 等において報告されている。

またシュドモナス属細菌がセラミダーゼを生産することが明らかにされており、該酵素はアルカリ性域に至適 pH を有するセラミダーゼである [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第273巻、第14368~14373頁 (1998) ]。

#### 【0004】

これらのセラミダーゼのうち、ヒト尿より精製された酸性セラミダーゼのアミノ酸配列および該酵素をコードする遺伝子の塩基配列が決定されている [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第271巻、第33110~33115頁 (1996) ]。また、該遺伝子との相同性を利用してマウスの酸性セラミダーゼ遺伝子を得られている [ジェノミックス (Genomics)、第50巻、第267~274頁 (1998) ]。

#### 【0005】

しかし哺乳類由来の単離されたセラミダーゼ遺伝子はいずれも酸性セラミダーゼをコードするものであり、哺乳類における中性・アルカリ性セラミダーゼのアミノ酸配列や遺伝子構造は全く知られておらず、高等生物における中性・アルカリ性セラミダーゼの生物学的機能も明らかにされていない。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

生体内におけるセラミドの機能の解明、その代謝の制御、セラミドに関連した疾病の診断、治療等の研究には、セラミドに関連する種々の酵素、ならびに該酵

素の遺伝子に関する詳細な情報を得る必要がある。ところが、上記のように哺乳類における中性・アルカリ性セラミダーゼのアミノ酸配列、その遺伝子に関する知見は得られていない。したがって、セラミドに関連する上記のような技術を開発するためには中性・アルカリ性セラミダーゼ、特にその遺伝子に関する知見を得る必要がある。

#### 【0007】

上記のように、哺乳類のセラミダーゼ遺伝子のクローニングについていくつかの報告があるが、これらはいずれも酸性領域で活性を示すセラミダーゼであり、中性・アルカリ性で活性を示すセラミダーゼとの間には高いホモロジーを期待できない。このため、酸性セラミダーゼ遺伝子の塩基配列のホモログとして中性・アルカリ性セラミダーゼ遺伝子を取得することは困難である。

#### 【0008】

したがって、本発明の第1の目的は、哺乳類の中性・アルカリ性セラミダーゼ遺伝子を提供することにある。本発明の第2の目的は、前記遺伝子を含む発現ベクターを導入した形質転換体を用いる遺伝子工学的に高純度の中性・アルカリ性セラミダーゼを製造する方法を提供することにある。本発明の第3の目的は、前記遺伝子がコードするポリペプチドを提供することにある。本発明の第4の目的は、本発明の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAを提供することにある。本発明の第5の目的は、本発明の遺伝子に特異的にハイブリダイズする合成オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーを提供することにある。本発明の第6の目的は、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片を提供することにある。

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、以上の状況に鑑みてなされたものである。

本発明者らは、哺乳類由来の中性・アルカリ性セラミダーゼの遺伝子を単離するために、マウス肝臓を材料として鋭意検討を行った結果、中性・アルカリ性セラミダーゼを単離することに成功し、更にはその遺伝子を単離する事に成功した。また、ハイブリダイゼーションやポリメラーゼ・チェーン・リアクション（P

CR)などの手法を用いることにより、ヒトを含む哺乳類の中性・アルカリ性セラミダーゼの構造を解明することに成功した。更に該遺伝子を用いて、遺伝子工学的手法により高純度な中性・アルカリ性セラミダーゼを簡便に製造することにも成功し、本発明を完成するに至った。

【0010】

即ち、本発明の要旨は、

- (1) 配列表の配列番号14に記載のアミノ酸配列、もしくはその一部であって、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、
- (2) 配列表の配列番号15に記載の塩基配列、もしくはその一部であって、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする前記(1)に記載の遺伝子、
- (3) 配列表の配列番号14に記載のアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが導入されたアミノ酸配列からなり、かつ、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、
- (4) 配列表の配列番号15に記載の塩基配列において、1個以上の塩基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが導入された塩基配列からなり、かつ、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、
- (5) 前記(2)～(4)いずれかに記載の遺伝子とストリンジェントな条件下においてハイブリダイズすることができ、かつ、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、
- (6) 前記(1)～(5)いずれかに記載の遺伝子を含んでなる組換えDNA、
- (7) 前記(6)に記載の組換えDNAを挿入されてなる、微生物、動物細胞又は植物細胞を宿主細胞とする発現ベクター、
- (8) 前記(7)に記載の発現ベクターを導入されてなる形質転換体、
- (9) 前記(8)に記載の形質転換体を培養し、該培養物よりセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法、
- (10) 前記(1)～(5)いずれかに記載の遺伝子によりコードされる、セラミダーゼ活性を有するポリペプチド、
- (11) 前記(1)～(5)いずれかに記載の遺伝子またはその一部に相補的な

アンチセンスDNA、

(12) 前記(1)～(5) いずれかに記載の遺伝子又はその一部に相補的なアンチセンスRNA、

(13) 前記(11) 記載のアンチセンスDNAを挿入されてなる発現ベクター

(14) 前記(1)～(5) いずれかに記載の遺伝子に特異的にハイブリダイズする合成オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー、

(15) 前記(10) 記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片、に関する。

#### 【0011】

##### 【発明の実施の形態】

#### (1) セラミダーゼ活性を有するポリペプチド

本明細書において、「セラミダーゼ活性を有するポリペプチド」(本明細書においては、単にセラミダーゼと記載する場合がある)とは、前記のようにセラミドをスフィンゴイドと脂肪酸に加水分解する活性を有する酵素をいう。また、「中性・アルカリ性セラミダーゼ」とは、酸性領域よりも高いpHに至適pHを有するセラミダーゼをいう。その一例として本発明において単離精製されたマウス肝臓由来の中性・アルカリ性セラミダーゼの酵素化学的、理化学的性質を記載する。

#### 【0012】

##### 1. 作用

本発明の酵素はセラミドを加水分解しスフィンゴイドと脂肪酸を生成する。

なお、当該酵素の活性は、例えば、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第273巻、第14368～14373頁(1998)に記載の方法に従って測定することができる。すなわち、2.0  $\mu$ lの2.5 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.5)中に550 pmolの、C12-NBD-セラミド[アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、第263巻、第183～188頁(1998)]、2.5 mM塩化カルシウム、0.25% (W/V) トリトン(Triton) X100および適量の酵素を溶解した反応混合液を37℃にて20分間インキュベートする。反応



液を沸騰水浴で5分インキュベートする事により反応を停止し、反応液は更に減圧乾固する。乾固物をクロロホルム/メタノール=2/1 (V/V) に溶解し、シリカゲル薄層クロマトグラフィ (展開溶媒: クロロホルム/メタノール/25%アンモニア水=90/20/0.5 (V/V/V) で展開した後、CS-9300クロマトスキャナー (島津製作所製) を用い励起波長475nm、蛍光波長525nmで測定を行った。本酵素の1ユニット (U) は、上記の条件下で1分間当たり1 $\mu$ モルのC12-NBD-脂肪酸がC12-NBD-セラミドから加水分解されて放出されるのに要する酵素量と定義する。

【0013】

## 2. 基質特異性

脂肪酸部分を $^{14}\text{C}$ 放射性同位体標識した各種スフィンゴ脂質100pmolに対し、本発明の酵素5mUを1% コール酸ナトリウムを含む25mMトリス-塩酸、pH7.5緩衝液20ml中で37℃、24時間作用させる。反応液はシリカゲル薄層クロマトグラフィにより展開後、イメージングアナライザーBAS1000 (富士フイルム社製) により $^{14}\text{C}$ -標識スフィンゴ脂質、ならびに酵素反応によって生じた $^{14}\text{C}$ -標識脂肪酸を検出定量し、分解率を算出した。その結果を表1に示す。

【0014】

【表 1】

基質 (構造)	分解率 (%)
N-ラウロイルスフィンゴシン (C12:0/d18:1)	6 3
N-パルミトイルスフィンゴシン (C16:0/d18:1)	9 3
N-ステアロイルスフィンゴシン (C18:0/d18:1)	8 3
N-パルミトイルスフィンガニン (C16:0/d18:0)	5 9
N-ステアロイルスフィンガニン (C18:0/d18:0)	4 0
N-パルミトイルフィトスフィンゴシン (C16:0/t18:0)	5
N-ステアロイルフィトスフィンゴシン (C18:0/t18:0)	2
NBD-N-ドデカノイルスフィンゴシン (NBD-C12:0/d18:1)	9 7
NBD-N-ヘキサノイルスフィンゴシン (NBD-C6:0/d18:1)	2
ガラクトシルセラミド (Galb1-1'Cer)	0
スルファチド (HSO3-3Galb1-1'Cer)	0
GM1a (Galb1-3GalNAcb1-4(NeuAca2-3)Galb1-4Glcbl-1'Cer)	0
スフィンゴミエリン (Choline phosphate Cer)	0

【 0 0 1 5 】

## 3. 至適 pH

0. 1 %トリトン X-100 を含む各 pH の 0. 15 M G T A 緩衝液 (50mM 3,3-dimethylglutaric acid、50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane、50 mM 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol) 20 ml 中、100 pmol の C 1 2 - N B D - セラミドに対し本発明の酵素 16 mU を 37℃、24 時間作用させた。反応液はシリカゲル薄層クロマトグラフィにより展開後、G S - 9 3 0 0 クロマトスキャナーを用い、検出波長 540 nm で N B D - 標識セラミド、ならびに酵素反応で生じた N B D - 標識脂肪酸を検出定量し、分解率を算出した。図 1 は C 1 2 - N B D - 標識セラミド分解活性と pH の関係を示す図であり、縦軸は分解率 (%)、横軸は反応 pH を示す。図 1 に示すとおり本酵素の至適 pH は 7. 0 ~ 8. 0 であった。

【 0 0 1 6 】

#### 4. 温度安定性

本発明の酵素は0.1% ルブロール (Lubrol) PXを含む20 mMトリス塩酸 (pH 7.5) 緩衝液中、37℃、24時間処理した場合には活性の低下は見られないが、60℃、1時間の処理により処理前の30%に活性が低下する。

【0017】

#### 5. 分子量

本発明の酵素の分子量は、SDS-PAGE (還元条件下) により約94 kDaである。またグリコペプチダーゼ Fにより消化された本酵素はSDS-PAGE (還元条件下) により約73 kDaである。

【0018】

なお、本明細書において、「セラミダーゼ活性を有するポリペプチド」の一例としては、配列表の配列番号14に示されたアミノ酸配列を有する、マウス由来の天然型のセラミダーゼポリペプチドが挙げられる。さらに、該アミノ酸配列を有するポリペプチドのみならず、上記のような方法での活性測定により同様のセラミダーゼ活性が認められるものであれば、配列表の配列番号14に示されるアミノ酸配列中に1個以上のアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入等の変異が導入されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも「セラミダーゼ活性を有するポリペプチドに」包含される。また前記変異は、得られたポリペプチドがセラミダーゼ活性を有する変異であれば、2種以上の変異が導入されていてもよい。

【0019】

#### (2) セラミダーゼ遺伝子

本発明においてセラミダーゼ遺伝子とは、上記の「セラミダーゼ活性を有するポリペプチド」をコードする遺伝子、または該遺伝子を含む遺伝子である。その一例としては、配列表の配列番号14に記載のアミノ酸配列またはその一部からなるポリペプチドをコードする遺伝子、配列表の配列番号15に記載の塩基配列またはその一部からなる遺伝子が挙げられるが、本発明はこれらに限定されるものではない。このように、配列番号14に記載のアミノ酸配列の一部からなるポリペプチドをコードする遺伝子または配列番号15に記載の塩基配列の一部からなる遺伝子であっても、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺

伝子であるかぎり本発明の範囲内である。これらは、マウス肝臓由来中性セラミダーゼの遺伝子であるが、本発明のセラミダーゼ遺伝子についてはその起源に特に限定はない。

#### 【0020】

さらに、同様のセラミダーゼ活性を有する、変異を有するセラミダーゼをコードする遺伝子も本発明に包含される。例えば、配列表の配列番号15に記載のアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換等の変異が導入されたアミノ酸配列をコードする遺伝子であっても、該アミノ酸配列からなるポリペプチドがセラミダーゼ活性を有する限り本発明の遺伝子に含まれる。このように天然から単離された遺伝子のみならず人為的に作成された遺伝子であっても、中性・アルカリ性セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子であるかぎり本発明に含まれる。

#### 【0021】

上記のような、人為的に変異の導入された遺伝子の作成方法としては、例えば以下のような方法が使用される。

ランダムな変異を導入する方法としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウムを用いた化学的な処理によりシトシン塩基をウラシル塩基に置換するトランジション変異を起こさせる方法【プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ・オブ・ザ・U S A、第79巻、第1408～1412頁（1982）】、マンガンを含む反応液中でPCRを行い、DNA合成時のヌクレオチドの取り込みの正確さを低くする方法【アナリティカル・バイオケミストリー（Anal. Biochem.）、第224、第347～353頁（1995）】等を用いることができる。

---

#### 【0022】

部位特異的変異を導入する方法としては、例えば、アンバー変異を利用する方法【ギャップド・デュプレックス（gapped duplex）法、ヌクレイック・アシッドズ・リサーチ（Nucleic Acids Research）、第12巻、第9441～9456頁（1984）】、*dut*（dUTPase）と*ung*（ウラシル-DNAグリコシラーゼ）遺伝子を欠損した宿主を利用する方法【クンケル（Kunkel）法、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ・オブ・ザ・U S A、第

82巻、第488～492頁(1985)」、アンバー変異を利用したPCRによる方法(国際公開98/02535号パンフレット)等を用いることができる。これらの方法で目的の遺伝子に部位特異的な変異を導入するための各種のキットが市販されており、該キットを利用することにより、所望の変異を導入された遺伝子を容易に取得することが可能である。

## 【0023】

また、本発明の遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができ、かつセラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子も本発明の遺伝子に含まれる。

## 【0024】

ここで、「ストリンジェントな条件」とは、例えば以下の条件を言う。すなわち、0.5% SDS、5×デンハルツ[Denhardt's、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400]及び100 µg/mlサケ精子DNAを含む6×SSC(1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)中で、50℃で4時間～一晩保温を行う条件を言う。

## 【0025】

また、ハイブリダイゼーション操作の詳細は、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)発行、T. マニアティス(T. Maniatis)ら編集、モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版(Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.)に記載されている。

## 【0026】

本発明において、組換えDNAとは、遺伝子工学的手法により、本発明の遺伝子を含んで得られるDNAである。

本発明のセラミダーゼ遺伝子を含む組換えDNAを公知のベクター等に連結し、セラミダーゼ遺伝子が発現可能な状態で挿入された発現ベクターを作成することができる。

## 【0027】

本発明において、発現ベクターとは、前記組換えDNAを挿入され、所望の宿主細胞で発現するように構築されたベクターである。また、後述のアンチセンスDNAを挿入したベクターも本発明の発現ベクターに含まれる。挿入されるベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクターいずれでも構わない。プラスミドベクターとしてはpUC18、pUC19、pBluescript、pETなどの市販品が好適に使用でき、ファージベクターとしては、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11等のラムダファージベクターなどの市販品が好適に使用できるが、これらに限定されるものではない。これらのベクターは用いる宿主細胞に応じて、適宜選ばれる。

## 【0028】

## (3) セラミダーゼ遺伝子を含有した形質転換体

本発明のセラミダーゼ遺伝子を挿入された発現ベクターで宿主の形質転換を行うことにより、本発明の形質転換体、すなわち本発明のセラミダーゼ遺伝子を発現する細胞を得ることができる。使用する宿主に特に限定はなく、大腸菌をはじめとする微生物の他、動物細胞、植物細胞等を用いることができる。

## 【0029】

発現ベクターを宿主に導入する方法としては、例えば、モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版、第249-254頁に記載の方法を用いることができる。次に、目的の遺伝子を発現する形質転換体を選択するためには、発現ベクターの特性を利用する。例えばプラスミドベクターがpBluescriptで、大腸菌を宿主細胞とする場合、アンピシリンを含むプレート上でアンピシリン耐性を有するコロニーを、あるいはアンピシリン、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド(X-Gal)及びイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を含むプレート上で、アンピシリン耐性を示し、かつ、白色を呈するコロニーを選択することにより外来遺伝子を導入されたコロニーを選別する。

## 【0030】

本発明の形質転換体の培養を通常用いられる条件で行なうことによってセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを生産させることができる。なお、本発明の遺

伝子を発現させる宿主により、コドン使用頻度が異なり、発現が抑制される場合があるが、この場合、本発明の遺伝子に使用されるコドンを、それぞれの宿主に合わせたコドンにかえて用いてもよい。また、前記発現ベクターは、プラスミド由来のベクターのみに限定されるものではなく、本発明の目的を妨げないものであれば、ファージ、コスミド等由来のベクターを用いてもよい。本発明のポリペプチドを容易にかつ大量に製造する観点から、外来遺伝子を誘導発現させることが可能なベクター、レポーター遺伝子産物との融合蛋白質として発現させることが可能なベクター等が望ましい。

#### 【0031】

セラミダーゼの発現の確認は、セラミダーゼ活性を測定することにより行なうことができる。活性測定は、例えば形質転換体の細胞抽出液を試料としてジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第273巻、第14368～14373頁（1998）に記載の方法で行なうことができる。また、セラミダーゼに対する抗体を使用することもできるが、セラミダーゼを他のポリペプチドとの融合体として発現させる場合にはそのポリペプチド部分に対する抗体を用いてもよい。抗体を使用する場合には、例えば形質転換体の細胞抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、ポリビニリデンフルオライド（PVDF）膜上に転写し、この膜上で抗体を用いて検出することができる。

#### 【0032】

##### （4）セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法

本発明は、本発明の遺伝子が発現され、該遺伝子がコードするポリペプチドが生産されるような条件下で上記の形質転換体を培養することにより、該培養物からセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを製造する方法を提供する。形質転換体の培養方法には特に限定はなく、使用された宿主に適した公知の培養方法から適当なものを選択すればよい。

#### 【0033】

本発明の製造方法において、上記の形質転換体が微生物あるいは培養細胞である場合には、培地組成、培地のpH、培養温度、培養時間の他、インデューサーの使用量、使用時間等についてセラミダーゼの発現に最適な条件を決定すること

によって、効率よくセラミダーゼを生産させることができる。

【0034】

形質転換体の培養物からセラミダーゼを精製するには通常の方法が用いられる。形質転換体が大腸菌のように細胞内にセラミダーゼが蓄積する場合には、培養終了後、遠心分離によって形質転換体細胞を集め、得られた細胞を超音波処理などによって破碎した後、遠心分離等によって無細胞抽出液を得る。これを出発材料とし、塩析法その他、イオン交換、ゲル濾過、疎水、アフィニティーなどの各種クロマトグラフィー等の一般的なタンパク質精製法により精製することができる。用いる用いる宿主-ベクター系によっては発現産物が細胞外に分泌される場合があるが、このような場合は培養上清から同様に精製を行えばよい。

【0035】

形質転換体が生産するセラミダーゼには、それが細胞内に生産されるときは細胞内の諸酵素、タンパク質が共存するが、これらは発現されるセラミダーゼの量に比べて微量にすぎないため、その精製は極めて容易である。また、ベクターとして細胞外分泌型のベクターを用いた場合、セラミダーゼが細胞外に分泌され、セラミダーゼを含む画分には、培地成分などが共存する。しかしながら、これらは通常セラミダーゼの精製の妨げとなるようなタンパク質成分をほとんど含まないため、例えば、マウス肝臓からのセラミダーゼの精製に必要であった煩雑な分離精製操作を必要としない。

【0036】

また、真核生物由来のセラミダーゼの場合、酵素自身に糖鎖を有している可能性があり、宿主細胞として糖鎖生合成能力を持たない細胞、例えば、大腸菌、枯草菌、放線菌のような原核生物、あるいは酵母、真菌、動物細胞、昆虫細胞及び植物細胞の糖鎖生合成能力を失った変異細胞を用いることによって、糖鎖を持たないセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを製造することができる。更に、糖鎖を有する酵素を生産することも可能であり、この場合は、宿主細胞として、糖鎖生合成能力を有する細胞、例えば、酵母、真菌、動物細胞、昆虫細胞及び植物細胞を用いることによって、糖鎖を持つセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを製造することができる。



## 【0037】

また、用いる宿主ベクター系によっては、発現産物が不溶性の封入体 (inclusion body) として形成されることがある。この場合、培養終了後に遠心分離によって細胞を集め、これを超音波処理などによって破碎した後、遠心分離等を行なうことにより封入体を含む不溶性画分を集める。封入体を洗浄した後、通常用いられるタンパク質可溶化剤、例えば尿素やグアニジン塩酸塩等で可溶化し、必要に応じてこれをイオン交換、ゲル濾過、疎水、アフィニティーなどの各種クロマトグラフィーを行なうことにより精製した後、透析法あるいは希釈法などを用いたりフォールディング操作を行なうことによってセラミダーゼ活性を保持したポリペプチドを含む標品を得ることができる。必要に応じてこの標品を更に各種クロマトグラフィーによって精製すれば、高純度のセラミダーゼ活性を有するポリペプチドを得ることができる。

## 【0038】

## (5) ハイブリダイゼーション用プローブ並びにPCR用プライマー

本発明のオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーは、本発明のセラミダーゼ遺伝子の塩基配列をもとに設計し、例えば、常法により化学的に合成し作製することができる。該オリゴヌクレオチドプローブの塩基配列には特に限定はないが、前記セラミダーゼ遺伝子、または該遺伝子に相補的な塩基配列を有する遺伝子にストリンジェントな条件下にハイブリダイズするものであればよい。また、上記のプライマーの塩基配列にも特に限定はなく、通常のPCRの反応条件において前記セラミダーゼ遺伝子、または該遺伝子に相補的な塩基配列を有する遺伝子にアニーリングし、DNAポリメラーゼによる伸長反応を開始できるものであればよい。

## 【0039】

上記のオリゴヌクレオチドプローブの鎖長としては、特に限定はないが、非特異的なハイブリダイゼーションを防止する観点から、15塩基以上であることが好ましく、18塩基以上であることがさらに好ましい。

## 【0040】

また、本発明のプライマーにおいても、前記オリゴヌクレオチドプローブと同

様の塩基配列を有する核酸が挙げられる。例えば、本発明の遺伝子の塩基配列をもとに設計し、化学的に合成すること等により作製することができる。プライマーの鎖長には、特に限定はないが、例えば、15～40塩基の鎖長のものを使用することができ、特に17～30塩基の鎖長のものを好適に使用することができる。前記プライマーはPCR法をはじめとする種々の遺伝子増幅法に使用することが可能であり、これによって本発明のセラミダーゼ遺伝子の検出を行うことができる。

## 【0041】

また、前記オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーとして、天然由来のセラミダーゼをコードする核酸を、制限酵素処理、エキソ型ヌクレアーゼ処理等の酵素的処理、超音波等の物理的処理等により断片化し、得られた断片を、アガロースゲル等に代表される各種核酸分離法により分離精製することにより得られた核酸を用いてもよい。前記のようにして得られた核酸は、セラミダーゼに特徴的な配列を有する領域由来であることが望ましい。

## 【0042】

さらに、前記オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーは、検出対象の核酸をより容易に検出をおこなうために、公知の方法にしたがって適当な標識を施し、本発明のセラミダーゼ遺伝子の検出に使用することができる。標識には、特に限定するものではないが、放射性同位元素の他、蛍光物質、ビオチンやジゴキシゲニンのようなリガンドなどに代表される各種の標識をおこなってもよい。

## 【0043】

本発明のハイブリダイゼーション用のプローブを用いて、マウス肝臓以外の臓器あるいはマウス以外の生物体由来のゲノムDNAもしくはcDNA、またはゲノムDNAライブラリーもしくはcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のセラミダーゼ遺伝子と相同性の高いDNAをクローニングすることができる。

## 【0044】

また、本発明のプライマーを用いて、マウス肝臓以外の臓器あるいはマウス以外の生物体由来のゲノムDNAもしくはcDNA、又はゲノムDNAライブラリ

ーもしくはcDNAライブラリーから、PCR法により本発明のセラミダーゼ遺伝子と相同性の高いDNA断片を検出したり、さらにはその全長の遺伝子を得ることもできる。

【0045】

(6) 遺伝子の検出方法

本発明の遺伝子の検出方法は、前記オリゴヌクレオチドプローブおよび／またはプライマーを使用し検出用試料中の遺伝子を検出することを1つの大きな特徴とする。

【0046】

本発明の検出方法においては、前記オリゴヌクレオチドプローブを用いてハイブリダイゼーション法などにより遺伝子の検出を行なってもよく、また、前記プライマーを用いて、PCR法などのDNA増幅方法により遺伝子の検出を行なってもよい。

【0047】

オリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションの場合、検出用試料としては、例えば、微生物のコロニーや培養細胞、組織切片のような試料、これらの試料中のDNAやRNAを膜上に固定したもの、これらの試料から抽出されたDNAやRNAなどが挙げられる。

【0048】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版等に記載の公知の方法にしたがって行なうことができる。当該ハイブリダイゼーションの条件は、用いるプローブのT<sub>m</sub>値、標的DNAのGC含量などにより適宜決定することができる。例えば、前記モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版に記載の条件などを適用できる。

【0049】

プライマーを用いて遺伝子の検出を行う場合、検出用試料としては、例えば、微生物培養液、微生物コロニー、微生物菌体のような微生物試料、培養細胞、組織、組織切片のような生体由来試料などが挙げられる。これらの試料は、例えば

、単離した微生物や培養細胞をそのままの状態でもよく、適切な処置を施した状態で用いてもよい。また組織のような固体試料は浸出液や懸濁液を調製して使用することができる。また、これらの試料の上清またはこれらの試料について界面活性剤処理のような細胞溶解処理が施された試料やその上清も使用することができる。さらに、検出対象である核酸を損なわない範囲で試料中の他の成分を除去する操作が施されていてもよい。

#### 【0050】

前記プライマーを用いてPCR法により検出を行なう場合、PCR条件は、用いるプライマーの $T_m$ 値、増幅し検出する対象の領域の長さなどにより、適宜選択することができる。PCR法では、増幅産物の有無を確認することにより目的の遺伝子を検出することができる。増幅の有無の確認法には特に限定はないが、例えば核酸増幅反応液をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを適当な核酸染色試薬、例えばエチジウムブロマイド、サイバー・グリーン I (SYBER Green I) 等で染色し、紫外線を照射して生じるバンドの有無を検出することにより確認できる。バンドの検出は肉眼で観察してもよいが、例えば蛍光イメージアナライザー等を用いて検出することもできる。

#### 【0051】

本発明の遺伝子の検出方法においては、検出感度を上昇させるために、前記プローブおよびプライマーを併用してもよい。例えば、前記プライマーを用いて、PCR法により、試料中に微量に存在するセラミダーゼ遺伝子を増幅し、ついで、プローブを用いて該遺伝子とハイブリダイズさせることによって、高感度かつ正確に検出することができる。

#### 【0052】

本発明の検出方法によりセラミダーゼ遺伝子の検出を行ない、さらに該遺伝子の量を決定する場合には、ハイブリダイズしたプローブに由来するシグナルの強度、プライマーを用いて増幅された産物に由来するバンドの蛍光強度などを定量することにより行なうことができる。mRNAを測定対象としてその定量を行うことにより、目的遺伝子の発現量を調べることができる。

## 【0053】

本発明の遺伝子の検出に用いるためのキットを作成することができる。該キットは、上記のオリゴヌクレオチドプローブおよび／または上記のプライマーを含んでなることを1つの特徴とする。該キットは検出操作に使用される種々のコンポーネントを含むものであることができる。特に限定するものではないが、例えば、オリゴヌクレオチドプローブを含むキットの場合には核酸を固定するための膜やハイブリダイゼーション緩衝液などに代表されるハイブリダイゼーション用の各種試薬、また、プライマーを含むキットの場合には耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTP混合液、PCR用緩衝液などに代表されるPCR用試薬を含んでいてもよい。さらに、プローブや増幅されたDNAを検出するための試薬や微生物増殖用の培地、細胞培養用の培地、試料より核酸を抽出するための試薬などを含有してもよい。

## 【0054】

(7) セラミダーゼ活性を有するポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその断片

本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその断片は、該ポリペプチドに特異的に結合する能力を有するものであれば、特に限定はなく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のどちらでもよい。さらに、公知技術により修飾された抗体や抗体の誘導体、例えばヒト化抗体、Fabフラグメント、単鎖抗体等を使用することもできる。本発明の抗体は、例えば、1992年、ジョン・ワイリー&サンズ社 (John Wiley & Sons, Inc) 発行、ジョン・E・コリガン (John E. Coligan) 編集、カレント・プロトコルズ・イン・イムノロジー (Current Protocols in Immunology) に記載の方法により、本発明のポリペプチドの全部または一部を用いてウサギやラット、マウス等を免疫することにより、容易に作製され得る。こうして得られた抗体を精製後、ペプチダーゼ等により処理することにより、抗体の断片が得られる。また、遺伝子工学的に抗体を作製することもできる。さらに、本発明の抗体またはその断片は、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法などによる検出を容易にするために、各種修飾をしてもよい。

【0055】

上記の抗体またはその断片には、ポリペプチドのある部分断片に特異的に結合しうるものも含まれる。

【0056】

得られた抗体またはその断片の用途としては、セラミダーゼ生産菌の検出、セラミダーゼ発現細胞株の検出、培養細胞や組織中のセラミダーゼタンパク質の検出、アフィニティークロマトグラフィー、各種ライブラリー（ゲノムDNAまたはcDNA）の発現産物のスクリーニング、医薬、診断薬、研究用試薬等への応用が考えられる。

【0057】

（8）ポリペプチドの検出方法

本発明のポリペプチドの検出方法は、前記抗体またはその断片を使用し、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドを検出することを特徴とする。

本発明においては、検出用試料として、例えば、微生物や動物細胞の培養物、組織切片、微生物や動物細胞の細胞破碎物、皮膚等の組織の抽出液あるいは洗浄液、微生物や動物細胞、組織由来のタンパク質が固定された膜などのタンパク質試料を用いることができる。

【0058】

抗体またはその断片の前記ポリペプチドへの特異的な結合の検出は、公知の方法が利用できるが、例えば、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法などが挙げられる。

【0059】

---

本発明のポリペプチドの検出方法に用いるためのキットを作成することができる。該キットは、上記の抗体またはその断片を含んでなることを特徴とする。また、該キットは反応用緩衝液、標識二次抗体、発色試薬などを含有してもよい。

---

【0060】

（9）アンチセンスDNA及びアンチセンスRNA

本発明において、「アンチセンスDNA」及び「アンチセンスRNA」とは、本発明のセラミダーゼ遺伝子又はその一部と相補的な塩基配列を有し、内因性の

セラミダーゼ遺伝子（ゲノムDNAおよびmRNA）と2本鎖を形成することによって、該遺伝子からの遺伝子情報の発現（転写、翻訳）を抑制又は制御するものを言う。アンチセンスDNA又はアンチセンスRNAの長さは、塩基配列の特異性や細胞内に導入する方法に応じて変えることが可能である。アンチセンスDNA又はアンチセンスRNAは、合成機を用いて人工的に合成したり、本発明の遺伝子を鋳型とした酵素反応によって通常と逆の向き（アンチセンスの向き）に遺伝子を発現させること等により、作製することが可能である。生体内においてアンチセンスRNAの発現が望まれる場合には、本発明の遺伝子を通常とは逆の向きに接続した発現ベクターを作成し、これを生体内に導入すればよい。

## 【0061】

例えば、tat 遺伝子 [ヌクレイック アシドズ リサーチ (Nucleic Acids Research)、第19巻、第3359～3368頁 (1991)]、あるいは rev 遺伝子 [プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ USA (Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA)、第86巻、第4244～4248頁 (1989)] を利用した HIV の増殖抑制等、アンチセンス技術は数多く知られており、従って、これらの方法により、本発明のアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAを用いて、内因性のセラミダーゼ遺伝子の発現を抑制又は制御することが可能である。また、本発明のアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAは、in situ ハイブリダイゼーション等の研究試薬として利用可能である。

## 【0062】

以下に、マウス肝臓由来セラミダーゼの遺伝子を取得する方法について説明する。

(1) まず、マウス肝臓のホモジネートより膜画分を調製し、これをショ糖-EDTA液に懸濁して凍結融解した後、遠心分離を行って上清（粗酵素抽出液）を得る。この粗酵素抽出液より公知のタンパク質精製方法、例えば各種のクロマトグラフィーを組み合わせることで単一な状態に精製されたセラミダーゼ標品を得ることができる。上記の精製に使用できるクロマトグラフィーとしては、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、キレートイオン交換クロマトグラフィー

、ゲルろ過クロマトグラフィー等を使用することができる。

【0063】

(2) 次にセラミダーゼ遺伝子をクローニングするためのプローブを作成するための情報として、セラミダーゼの部分アミノ酸配列を調べる。上記の精製セラミダーゼ標品をそのままエドマン分解法〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第256巻、第7990～7997頁(1981)〕によるアミノ酸配列分析に供することにより、セラミダーゼのN末端アミノ酸配列を知ることができる。また、精製酵素標品を基質特異性の高いプロテアーゼ、例えばリジルエンドペプチダーゼやN-トシル-L-フェニルアラニルクロロメチルケトン(TPCK)-トリプシン等で消化して得られるペプチド混合物より適当なペプチド断片を精製し、該断片についてアミノ酸配列分析を行うことにより、セラミダーゼ内部の部分アミノ酸配列を得ることができる。

【0064】

(3) こうして明らかとなったアミノ酸配列の情報をもとに、ハイブリダイゼーション用のプローブ、またはPCR用のプライマーとして使用するためのオリゴヌクレオチドを設計し、本発明のセラミダーゼ遺伝子をクローニングする。そのためには、一般的に用いられるPCRまたはハイブリダイゼーション法を利用する。PCR法は、1989年、ストックトン・プレス(Stockton Press)社発行、エルリッヒ H A(Erhlich, H.A.) 編集、PCRテクノロジー(PCR Technology)に記載の方法に準じて行うことができる。ハイブリダイゼーション法は、例えばモレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版に記載の方法に準じて行うことができる。

【0065】

(4) 上記のハイブリダイゼーションまたはPCRによって得られたDNA断片は、その塩基配列を解読することにより、そこにコードされうるアミノ酸配列を知ることができる。該配列を、上記(2)で得られたセラミダーゼの部分アミノ酸配列と比較し、上記のDNA断片がセラミダーゼ遺伝子の断片であるかどうかを確認することができる。

【0066】



(5) (3) のハイブリダイゼーションまたは PCR によって得られた DNA 断片がセラミダーゼ遺伝子の一部であった場合、(3) の操作を繰り返すか、あるいは (3) で得られた DNA 断片の塩基配列をもとに新たなプローブ、プライマーを作成し、これを使用してハイブリダイゼーションまたは PCR を実施することにより、セラミダーゼ全長をコードする遺伝子を含む DNA 断片を得ることができる。

## 【0067】

(6) こうして得られたセラミダーゼ全長をコードする遺伝子を適当なベクターに接続して発現ベクターを構築し、該発現ベクターが導入された形質転換体を作成する。この形質転換体を培養して、培養物中のセラミダーゼ活性を調べることにより、得られた遺伝子がセラミダーゼをコードするものであることを確認することができる。

## 【0068】

しかしながら、本発明のセラミダーゼ遺伝子のクローニングにおいて、本発明において得られた部分アミノ酸配列情報ではハイブリダイゼーション法によるライブラリーのスクリーニングに適したプローブ DNA を設計することはできなかった。また、部分アミノ酸配列及びライブラリー作成に使用したベクターの塩基配列それぞれから様々な PCR プライマーを設計し、各種組み合わせで PCR を行ったが特異的な増幅は見られず、唯一、部分アミノ酸配列 C-53 (配列表の配列番号 3 に C-53 のアミノ酸配列を示す) をもとに設計した 2 種のプライマー同士の組み合わせのみに増幅が見られた。ただし増幅された DNA 断片 P-1 (配列表の配列番号 6 に P-1 の塩基配列を示す) は 68 bp と短いものであり、そのままハイブリダイゼーション法によるライブラリーのスクリーニング用プローブとして用いることはできなかった。そこで P-1 の配列からさらに PCR プライマーを設計するとともに、これをライブラリー作成に使用されたベクターの塩基配列から設計されたプライマーと組み合わせで PCR を行うことにより、初めてハイブリダイゼーション法によるライブラリーのスクリーニング用のプローブに適していると考えられる 335 bp の遺伝子断片を得ることに成功した。

## 【0069】

さらに、前記 335 bp の DNA 断片をプローブにして、マウス肝臓由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、セラミダーゼ全長をコードする遺伝子をクローニングすることができる。また、マウス肝臓由来のゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のセラミダーゼのゲノム DNA を得ることも可能である。

#### 【0070】

以上のようにして得られる、マウス肝臓の産生するセラミダーゼ遺伝子の全塩基配列は、配列表の配列番号 12 に記載されており、ここにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は配列表の配列番号 13 に記載されている。なお、このアミノ酸配列と当該酵素の N 末端アミノ酸配列より、生体内において当該酵素は N 末端部分のペプチドが除去された成熟型酵素にプロセッシングされることが判明した。この成熟型セラミダーゼのアミノ酸配列、ならびに該配列をコードする塩基配列を、それぞれ配列表の配列番号 14、15 に示す。上記のアミノ酸配列、塩基配列は、それぞれ公知の哺乳類由来セラミダーゼのアミノ酸配列、塩基配列との間にはホモロジーはない。すなわち、本発明により提供されるセラミダーゼ遺伝子は公知のセラミダーゼ遺伝子とは関係のない、全く新しい配列からなるものである。

#### 【0071】

このように、本発明により、マウス肝臓由来のセラミダーゼの一次構造及び遺伝子構造が提供される。更に、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドの安価で高純度な遺伝子工学的な製造方法が可能となる。

#### 【0072】

また、本発明のセラミダーゼ遺伝子に特異的にハイブリダイズする合成オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーは、本発明のセラミダーゼ遺伝子の検索、検出や増幅等に有用である。本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体又はその断片は、セラミダーゼの検出、同定や精製等において有用である。

#### 【0073】

#### 【実施例】

以下に実施例をもってさらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範

図に限定されるものではない。

【0074】

実施例 1 セラミダーゼの精製

105匹のSea/ddYマウス（成和実験動物研究所製）から摘出した肝臓181gを1mM EDTAを含む0.25M ショ糖液（ショ糖-EDTA液）300ml中でホモジナイズした。このホモジネートを600×gで10分間遠心分離した後、上清を回収し、さらに2700×gで30分間遠心分離し沈殿を回収した。

【0075】

沈殿画分を480mlのショ糖-EDTA液に懸濁し、-80℃で凍結した後、流水下で解凍した。この凍結、解凍操作を2回繰り返した後、懸濁液を105000×gで90分間遠心分離し上清、沈殿をそれぞれ回収した。沈殿は上記同様の凍結、解凍～遠心分離に供し、上清を回収して先の上清と合わせ、520mlの粗酵素抽出液を得た。

【0076】

粗抽出液260mlを20mM リン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化した100mlのDEAE-セファロースFF（アマシャム・ファルマシア社製）カラムにアプライし、非吸着物質を洗浄除去した後、1M NaClを含む同緩衝液による溶出を行い、セラミダーゼ活性画分160mlを回収した。該画分は、続いて1M NaClを含む20mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）で平衡化した100mlのフェニル-セファロースFF（アマシャム・ファルマシア社製）カラムにアプライした後、2Mか0MへのNaClの濃度グラジエントで溶出し、更に0%から1%へのルブロールPX（ナカライテスク社製）の濃度グラジエントで溶出した。このクロマトグラフィーにより、310mlのセラミダーゼ活性画分を回収した。

【0077】

得られた活性画分を、0.5M NaCl、0.1%のルブロールPXを含む20mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）で平衡化した25mlのキレーティング-セファロースFF（アマシャム・ファルマシア社製、Cu<sup>2+</sup>結合型）カラムにアプライした。カラムを同緩衝液及び0.1%のルブロールPXを含む2

0 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した後、2 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.1% のルブロール PX を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で酵素の溶出を行った。溶出された活性画分は限外ろ過により濃縮したうえ、緩衝液を 0.1% のルブロール PX を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に置換をした。得られた酵素液 30 ml は、更に 0.1% のルブロール PX を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したポロス HQ カラム ( $\phi 4.6 \times 100$  mm、パーセプティブ・バイオシステムズ社製) にアプライした後、0 M から 0.5 M への  $\text{NaCl}$  の濃度グラジエントで溶出した。この活性画分を 0.2 M  $\text{NaCl}$ 、0.1% のルブロール PX を含む 1 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム ( $\phi 7.5 \times 100$  mm、ペンタックス社製) にアプライした。セラミダーゼは本カラムに吸着せず通過画分に回収された。該画分は、次いで 0.2 M  $\text{NaCl}$ 、0.3% のルブロール PX を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したスーパーロース 200 HR カラム ( $\phi 10 \times 300$  mm、アマシャム・ファルマシア社製) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供し、精製セラミダーゼを得た。以上の精製操作の結果、58 mg の精製セラミダーゼ標品を得た。

【0078】

#### 実施例 2 セラミダーゼの部分アミノ酸配列分析

50 pmol のセラミダーゼを含有する試料液 11 ml に、0.3% のルブロール PX を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加えた後、Mono Q PC16/5 カラム ( $100 \mu\text{l}$ 、アマシャム・ファルマシア社製) にアプライした。続いて 0.4 M  $\text{NaCl}$  を含む同緩衝液でカラムに吸着したセラミダーゼを溶出した。この操作によりセラミダーゼは  $50 \mu\text{l}$  に濃縮された。この濃縮液を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、泳動後のゲルをゲルコード・ブルー・ステイン・リジェント (GelCode Blue Stain reagent、ピアス社製) で染色してセラミダーゼのバンドを切り出した。切り出されたゲル断片の  $1/4$  を 0.1% SDS を含む  $300 \mu\text{l}$  の 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) で 37℃、16 時間抽出した。得られた抽出液を試料として、G1005A プロテインシーケンシングシステム (ヒューレット・パッカード社製)

を用いてセラミダーゼのN末端アミノ酸配列解析を行い、アミノ酸配列N-termを決定した。配列表の配列番号1にN-termのアミノ酸配列を示す。

【0079】

また、切り出されたゲル断片の残り3/4は、1mlの0.5M トリスー塩酸緩衝液(pH9.2)/50%アセトニトリル中で30℃、45分洗浄した。窒素ガスおよび遠心濃縮機を使用してゲルを完全に乾燥させた後、0.5μgのプロテアーゼLys-C(和光純薬社製)を含む10μlの0.5M トリスー塩酸緩衝液(pH9.2)を加え、更にゲルが完全に膨潤するまで0.1M トリスー塩酸緩衝液(pH9.2)を加えて37℃で16時間保温し、セラミダーゼのプロテアーゼ消化を行った。反応終了後、ここに150μlの0.1%トリフルオロ酢酸/60%アセトニトリルを添加し、室温で1時間抽出する操作を2回行って抽出液を回収した。この抽出液を逆相クロマトグラフィーに供し、ペプチド断片の精製を行った。得られたペプチド断片をG1005Aプロテインシーケンシングシステムを用いたエドマン分解法により分析し、部分アミノ酸配列C-46、C-53を決定した。配列表の配列番号2、3にそれぞれC-46、C-53のアミノ酸配列を示す。

【0080】

実施例3 セラミダーゼ遺伝子を含むDNA断片のPCR法による増幅

実施例2で決定したセラミダーゼの部分アミノ酸配列C-53をもとに、センスミックスプライマー53-S1、アンチセンスミックスプライマー53-A3をデザインし、DNA合成機で合成した。配列表の配列番号4、5にそれぞれプライマー53-S1、53-A3の塩基配列を示す。これらのプライマーを用いてPCR反応を行った。PCRはマウス肝臓cDNAプラスミドライブラリー(宝酒造社製)を鋳型として行った。PCR反応は、94℃、9分の後、94℃、0.5分~51℃、0.5分~72℃、1分を1サイクルとする40サイクルを行い、さらに72℃、7分保温することにより行った。このPCR反応で、約70bpの特異的な増幅DNA断片がアガロース電気泳動で検出された。

【0081】

この増幅DNAをゲルより回収し、これをpGEM-T easyベクター(

プロメガ社製)に組み込んだ組換えプラスミドを作成した。該プラスミドの挿入 DNA 断片の塩基配列解析を行った結果、この断片の部分塩基配列 P-1 が決定された。配列表の配列番号 6 に P-1 の塩基配列を示す。該配列は (2) で決定されたセラミダーゼの部分アミノ酸配列 C-53 に対応する配列であり、目的とするセラミダーゼの遺伝子の一部が取得できたことが確認された。

#### 【0082】

この P-1 の塩基配列をもとに、アンチセンスプライマー MA1 および MA2 をデザインして合成した。配列表の配列番号 7、8 にそれぞれプライマー MA1、MA2 の塩基配列を示す。またマウス肝臓 cDNA プラスミドライブラリーの構築に用いられたベクター pAP3neo の塩基配列をもとにセンスプライマー T7in および T7out をデザインし合成した。配列表の配列番号 9、10 にそれぞれプライマー T7in、T7out の塩基配列を示す。これらのプライマーを用いてマウス肝臓 cDNA ライブラリーを鋳型としたネステッド PCR を行った。1st PCR として、まずセンスプライマー T7out およびアンチセンスプライマー MA2 を使用して 94℃、9 分の後、94℃、0.5 分～51℃、0.5 分～72℃、2 分を 1 サイクルとする 40 サイクルの反応を行い、さらに 72℃、7 分間保温した。さらに 2nd PCR は 1st PCR の反応液を鋳型とし、センスプライマー T7in およびアンチセンスプライマー MA1 を使用する以外は 1st PCR と同じ条件で行った。この結果 335 bp の増幅 DNA 断片が得られた。これを以下に示すコロニーハイブリダイゼーションのプロープとした。

#### 【0083】

#### 実施例 4 セラミダーゼ遺伝子のクローニング

マウス肝臓 cDNA プラスミドライブラリーを導入された形質転換体を、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む LB 寒天培地プレート上のナイロンフィルター (商品名: ハイボンド N<sup>+</sup>、アマシャムファルマシア社製) に撒き、9.5 × 13.5 cm のプレート 1 枚当たり 約 3 万個のコロニーを形成させてマスターフィルターを作成した。このフィルターのレプリカを作成し、10% SDS 溶液に浸したろ紙上で 5 分間、0.5 M NaOH、1.5 M NaCl 溶液に浸した

ろ紙上で 5 分間 (変性)、3M NaCl を含む 0.5M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に浸したろ紙上で 5 分間 (中和)、2×SSC 溶液に浸したろ紙上で 5 分間、それぞれ処理した後、2×SSC 溶液でフィルターをリンスした。このフィルターを風乾したのち、紫外線照射により DNA をフィルターに固定し、コロニーハイブリダイゼーション用のフィルターとした。

## 【0084】

ハイブリダイゼーションのプロブとしては、実施例 3 で得た増幅 DNA 断片 0.1  $\mu$ g 相当を DNA ラベリングキット、レディー・トゥー・ゴー (Ready To Go、ファルマシア社製) を用いて、同キットのプロトコールに従って  $^{32}$ P で標識したものを用了。上記のフィルターをハイブリバッグに入れ、7% PEG 6000、10% SDS 溶液 (ハイブリダイゼーション溶液中)、60℃ で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記の標識プロブを 0.006 pmol/ml となるように加え、60℃ で一晩ハイブリダイゼーションを行った。次に 60℃ に加温しておいた洗浄液 (2×SSC、0.1% SDS) 中、60℃ で 15 分間ずつ 3 回、フィルターを洗浄した。フィルターより余分な水分を除いた後、富士フィルム社製イメージングプレートに 20 分間感光した後、BAS 1000 イメージングアナライザー (富士フィルム社製) にてシグナルを検出した。次いで本操作により得られた陽性シグナルに対応するマスターフィルター上のコロニーを採取した (1 次スクリーニング)。

## 【0085】

採集したコロニーは 100  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地に懸濁した後 100  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む 9.5×13.5 cm LB 寒天培地プレート上のナイロンフィルターに撒き、1 枚当たり 200~1000 個のコロニーを形成させてマスターフィルターを作成した。このフィルターについて 1 次スクリーニングと同様の方法により陽性クローンのスクリーニングを行い、さらに同様の操作で 3 次スクリーニングを実施した。3 次スクリーニングの結果セラミダーゼ遺伝子を含むと考えられる陽性クローンを単離することができた。

## 【0086】

この陽性クローンよりプラスミドを調製し、これをプラスミド pLCDase

と命名した。該プラスミドを種々の制限酵素、もしくは複数の制限酵素の組み合わせで消化したうえ、生成した各DNA断片をサブクローニングしてその塩基配列を解析してプラスミドpLCDaseに挿入されたDNA断片の全塩基配列を決定した。該配列を配列表の配列番号11に示す。また、該配列中に見出されたオープン・リーディング・フレーム（ORF）の塩基配列、ならびにそこにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を、それぞれ配列表の配列番号12、13に示す。さらに、上記のDNA断片の制限酵素地図と、そこに含有されるオープン・リーディング・フレームの位置を図2に示す。

## 【0087】

上記のORFの塩基配列を解析したところ、ここには実施例2で明らかにされたセラミダーゼの部分アミノ酸配列をコードする塩基配列が含まれており、このORFがセラミダーゼをコードするものであることが確認された。また、該ORFにコードされるセラミダーゼのアミノ酸配列と、配列表の配列番号1に示されるセラミダーゼのアミノ酸配列とを比較すると、マウス肝臓より精製されたセラミダーゼは上記のORFにコードされるポリペプチドのうちのN末端部分のペプチドを欠いていた。すなわち、セラミダーゼは翻訳後にそのN末端部分を除去するプロセッシングを受けて成熟型酵素に変換されることが示された。配列表の配列番号14に成熟型セラミダーゼのアミノ酸配列を、また、配列表の配列番号15に成熟型セラミダーゼをコードする塩基配列をそれぞれ示す。

## 【0088】

## 実施例5 セラミダーゼ遺伝子の発現

直径35mmのディッシュに培養されたCHO細胞に、実施例4で得られたプラスミドpLCDase 1 $\mu$ gと、リポフェクトアミン（ライフ・テクノロジーズ社製）5 $\mu$ lとを加えることにより、セラミダーゼ遺伝子をCHO細胞に導入した。この細胞を37℃で72時間培養後、細胞を破碎した。得られた細胞破碎液について、上記のC12-NBD-セラミドを基質とするセラミダーゼ活性測定を行ったところ、この細胞においてセラミダーゼが発現されていることが確認された。

## 【0089】



【発明の効果】

本発明により、哺乳類由来の中性・アルカリ性セラミダーゼをコードする遺伝子が提供され、また、該遺伝子を用いるセラミダーゼの遺伝子工学的な増補方が提供される。また、該遺伝子の検出に有用なオリゴヌクレオチドプローブ、プライマーが提供される。さらに該遺伝子のアンチセンスDNA、アンチセンスRNAが提供され、これらは生体内におけるセラミダーゼ活性の制御、セラミド代謝系の調節に有用である。

【 0 0 9 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> A gene encoding ceramidase

<130> T-1373

<160> 15

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Xaa is an unknown amino acid.

<400> 1

Phe Ser Gly Tyr Tyr Ile Xaa Val Xaa Arg Ala Asp Xaa Thr Gly

1 5 10 15

Lys Val Asn Asp Ile Asn

20

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Mouse

<220>

<223> Xaa is an unknown amino acid.

<400> 2

Ala Ile Ala Thr Asp Thr Val Ala Xaa Met

1 5 10

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> Mouse

---

<220>

<223> Xaa is an unknown amino acid.

---

<400> 3

Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Gly Pro Phe Val Asn Gly Phe Ala Ser

1 5 10 15

Ser Asn Leu Gly Asp Val Ser Pro Asn Ile Leu Gly Pro Xaa Xaa

20  
Val Asn Thr Gly Glu  
35

25

30

<210> 4  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

<400> 4  
carggnccnt tygtngc 17

<210> 5  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

---

<400> 5  
ggncnagda trttngg 17

---

<210> 6  
<211> 38  
<212> DNA

<213> Mouse

<400> 6

gcaggctttg cticcatcaaa tctcggagac gtgtcacc

38

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

ttgatgaagc aaagcctgc

19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

ggtgacacgt ctccgagat

19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

taatacgact cactataggg 20

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

tctgctctaa aagctgc 17

<210> 11

<211> 3108

---

<212> DNA

<213> Mouse

---

<400> 11

cctgcgccac ttctctctcc cggtcaatc gcggagcctt ttctctcccc cgtctcgccg 60

ctgccgccat ctccacccct gcctgcccc a ggggtctgtg gacgcccggg cagagagcaa 120

gcaccgagct gggcctgctg gagaccggag accagcggcc cgcccggccc cccgctgcga 180

gcctcctgag cagctccgga acagcttact ttctgtttcc atctctttcg gaccgggttg	240
gcctctccaa aagccacttc tcctaactct tatcaagggtt caaaggctaa aggtctgtac	300
acatgagtg c tggtgtgctt agaggcatcg ggtccctttc agctggaggtt gcagtacttg	360
tgagtgccat ggaatccaaa ttcggcaaga gatacaatct aaactctcaa ctactccaga	420
ttcaagggtt accctacttt ctggttacca aaggagcttt gcggggccgc tctgacatcc	480
agtagatttg gaaacacatt gagaaatcag cctgagcaac ctgcaaggca caaggcacia	540
gattctgcat gggtattttgc tctcccagga ggtgaacact tgttttgatt cacagagtca	600
gggttgagat gccagttgt tccctatctt ggctcagaag aagcacctag gaataaaagc	660
tctaagctgg tattaagtag aatgggctta aagtccacta caggaaacaa cagctagtga	720
cagaaatggc aaagcgaacc ttctccacct tggaggcatt cctcattttc ctcttggtta	780
taatgacagt catcacagtg gcccttctca cctctttgtt tgttaccagt gggaccattg	840
aaaaccacia agattcagga aatcactggt tticaaccac tctgggctcc acgacaacct	900
agccccctcc aattacacag actccaaact tcccttcatt tccgaacttc agtggctact	960
acattggcgt tgggagagcg gattgcacag gacaagtgtc agatatcaat ttgatgggct	1020
atggcaaaaa tggccagaat gcacggggtc tccctaccag gctgttcagc cgtgctttta	1080
tcttggcgga tccagatggg tcaaatcgaa tggcatttgt gagcgtggaa ctatgtatga	1140
tttcccaacg actgaggttg gaggtcctga agagactaga gagtaaatat ggctctctgt	1200
atcgaagaga caatgtttatc ctgagtgcc a ttcacacaca ctctggccca gcagggtttt	1260
tccaatatac actctatata ctgcagcg agggattcag caaccggacc tticagtaca	1320
tagtctctgg gatcatgaag agcattgata tagctcacac aaatcttaaa ccaggcaaaa	1380
tctttatcaa caaaggaaat gttgctaatt tgcagatcaa ccgaagcccc tccctttacc	1440
ttctgaatcc acagtcagag agagcaagggt attcttcaaa cacagacaag gaaatgctgg	1500
<hr/>	
tcttgaaact ggtggatttg aatggagaag acttgggtct tatcagctgg ttigccatcc	1620
accccgtag catgaacaat agcaaccact ttgtgaatag tgacaatatg ggctatgcgg	1620
<hr/>	
cttacctttt tgagcaagaa aagaacaaag gctatctgcc tggacaggga ccgtttgtag	1680
caggctttgc ttcatcaaat ctcgagacg tgtcaccaa cattcttggc ccgcattgtg	1740
tcaacacagg ggagtcttgt gacaacgaca agagcacctg tccaacgggt gggcctagca	1800
tgtgcatggc cagcggacct ggacaagaca tgtttgagag cacacacatt ataggacgga	1860
tcattctatca gaaggccaag gagctgtatg cctctgcctc ccaggagggtg accggcccag	1920

tgcttgcagc tcaccagtgg gtgaacatga cagatgtgag cgtccagctc aatgccacac 1980  
 acacagtga gacgtgtaaa cctgccctgg gctacagttt tgccgcaggc acaattgatg 2040  
 gagtttcggg cctcaatatt acacagggaa ctacggaagg ggatccattc tgggacactc 2100  
 ttccgggacca gctcttggga aaaccatctg aagagattgt agagtgtcag aaacccaaac 2160  
 caatcctgct tcacagtggg gagctgacga taccacatcc ttggcaacca gatattgttg 2220  
 atgttcagat tgttacggtt gggtccttgg ccatagctgc tatccctggg gaattaacaa 2280  
 ccatgtcggg acgaagattt cgtgaggcaa ttaaaaaaga atttgcactt tatgggatga 2340  
 aggatatgac cgttgtttatc gcagggtctaa gcaatgttta tacacattac attaccacat 2400  
 atgaagaata ccaggctcag cggtagcagg cagcatctac aatctatgga ccacacaccc 2460  
 tgtctgcata catccaactc ttacagagacc ttgctaaggc aattgctacg gacacagtag 2520  
 ccaacatgag cagtgggtccc gagcctccat tcttcaaaaa tctaatagct tcacttattc 2580  
 ctaatatatgc ggatagagca ccaattggca aacatttttg ggatgtcttg cagccagcaa 2640  
 aacctgaata cagagtggga gaagtgggtg aagttatatt tgtaggcgct aacccaaaga 2700  
 attcagcaga gaaccagacc catcaaacct tcttactgtt ggagaaatac gaggactctg 2760  
 tagctgactg gcagataatg tataacgatg cctcctggga gacgaggttt tattggcaca 2820  
 aaggaatact gggtctgagc aatgcaacaa tatactggca tattccagat actgcctacc 2880  
 ctggaatcta cagaataaga tattttggac acaatcggaa gcaggaactt ctgaaacccg 2940  
 ctgtcactat agcatttgaa ggaatttctt ctccttttga agttgtcact acttagtgaa 3000  
 aagttgacag atattgaaga aaagcttttc tctgtgcaca ttatagagtg aattcacaaa 3060  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 3108

<210> 12

<211> 2271

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 12

atggcaaagc gaaccttctc caccttggag gcattcctca tttccttct ggtaataatg 60  
 acagtcatca cagtggccct tctcaccctc ttgtttgtta ccagtgggac cattgaaaac 120

cacaaagatt caggaaatca ctggttttca accactctgg gctccacgac aaccagccc	180
cciccaatta cacagactcc aaacttccct tcatttcgga acttcagtgg ctactacatt	240
ggcgttggga gagcggattg cacaggacaa gtgtcagata tcaatttgat gggctatggc	300
aaaaatggcc agaatgcacg gggctcctc accaggctgt tcagccgtgc ttttatcttg	360
gcggatccag atgggtcaaa tcgaatggca tttgtgagcg tggaactatg tatgatttcc	420
caacgactga ggttggaggt cctgaagaga ctagagagta aatatggctc tctgtatcga	480
agagacaatg ttatcctgag tgccattcac acacactctg gccagcagg gtttttccaa	540
tatacactct atatactcgc cagcgaggga ttacgaacc ggacctttca gtacatagtc	600
tctgggatca tgaagagcat tgatatagct cacacaaatc ttaaaccagg caaaatcttt	660
atcaacaaag gaaatgttgc taatgtgcag atcaaccgaa gcccctcctc ttaccttctg	720
aatccacagt cagagagagc aaggtattct tcaaacacag acaaggaaat gctggtcttg	780
aaactggtgg atttgaatgg agaagacttg ggtcttatca gctggtttgc catccacccc	840
gtgagcatga acaatagcaa ccactttgtg aatagtgaca atatgggcta tgcggcttac	900
ctttttgagc aagaaaagaa caaaggctat ctgcctggac agggaccgtt tgtagcaggc	960
tttgcttcat caaatctcgg agacgtgtca cccaacattc ttggcccgca ttgtgtcaac	1020
acaggggagt ctgtgacaa cgacaagagc acctgtccca acggtgggcc tagcatgtgc	1080
atggccagcg gacctggaca agacatgttt gagagcacac acattatagg acggatcatc	1140
tatcagaagg ccaaggagct gtatgcctct gccctccagg aggtgaccgg ccagtgctt	1200
gcagctcacc agtgggtgaa catgacagat gtgagcgtcc agtcaatgc cacacacaca	1260
gtgaagacgt gtaaacctgc cctgggctac agttttgccg caggcacaat tgatggagtt	1320
tcgggcctca atattacaca gggaactacg gaaggggatc cattctggga cactcttcgg	1380
gaccagctct tgggaaaacc atctgaagag attgtagagt gtcagaaacc caaaccaatc	1440
ctgcttcaca gtggagagct gacgatacca catccttggc aaccagatat tgttgatgtt	1500
cagattgtta ccgttgggtc ctggccata gctgctatcc ctggggaatt aacaaccatg	1620
tcgggacgaa gatttcgtga ggcaattaaa aaagaatttg cactttatgg gatgaaggat	1620
atgaccgttg ttatcgcagg tctaagcaat gtttatacac attacattac cacatatgaa	1680
gaataccagg ctacagcgta cgaggcagca tctacaatct atggaccaca caccctgtct	1740
gcatacatcc aactcttcag agaccttgct aaggcaattg ctacggacac agtagccaac	1800
atgagcagtg gtcccagacc tccattcttc aaaaatctaa tagcttcact tattccta	1860



attgcggata gagcaccaat tggcaaacat tttggggatg tcttgcagcc agcaaaacct 1920  
 gaatacagag tgggagaagt ggttgaagtt atattttagt gcgctaaccc aaagaattca 1980  
 gcagagaacc agacccatca aaccttcctc actgtggaga aatacgagga ctctgtagct 2040  
 gactggcaga taatgtataa cgaatgcctcc tgggagacga ggttttattg gcacaaagga 2100  
 atactgggtc tgagcaatgc aacaatatac tggcatattc cagatactgc ctaccctgga 2160  
 atctacagaa taagatatatt tggacacaaat cggaagcagg aacttctgaa acccgctgtc 2220  
 atactagcat ttgaaggaat ttcttctcct tttgaagttg tcactactta g 2271

<210> 13

<211> 756

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 13

Met Ala Lys Arg Thr Phe Ser Thr Leu Glu Ala Phe Leu Ile Phe

1 5 10 15

Leu Leu Val Ile Met Thr Val Ile Thr Val Ala Leu Leu Thr Leu

20 25 30

Leu Phe Val Thr Ser Gly Thr Ile Glu Asn His Lys Asp Ser Gly

35 40 45

Asn His Trp Phe Ser Thr Thr Leu Gly Ser Thr Thr Thr Gln Pro

50 55 60

---

Pro Pro Ile Thr Gln Thr Pro Asn Phe Pro Ser Phe Arg Asn Phe

65 70 75

---

Ser Gly Tyr Tyr Ile Gly Val Gly Arg Ala Asp Cys Thr Gly Gln

80 85 90

Val Ser Asp Ile Asn Leu Met Gly Tyr Gly Lys Asn Gly Gln Asn

95 100 105

Ala Arg Gly Leu Leu Thr Arg Leu Phe Ser Arg Ala Phe Ile Leu

110	115	120
Ala Asp Pro Asp Gly Ser Asn Arg Met Ala Phe Val Ser Val Glu		
125	130	135
Leu Cys Met Ile Ser Gln Arg Leu Arg Leu Glu Val Leu Lys Arg		
140	145	150
Leu Glu Ser Lys Tyr Gly Ser Leu Tyr Arg Arg Asp Asn Val Ile		
155	160	165
Leu Ser Ala Ile His Thr His Ser Gly Pro Ala Gly Phe Phe Gln		
170	175	180
Tyr Thr Leu Tyr Ile Leu Ala Ser Glu Gly Phe Ser Asn Arg Thr		
185	190	195
Phe Gln Tyr Ile Val Ser Gly Ile Met Lys Ser Ile Asp Ile Ala		
200	205	210
His Thr Asn Leu Lys Pro Gly Lys Ile Phe Ile Asn Lys Gly Asn		
215	220	225
Val Ala Asn Val Gln Ile Asn Arg Ser Pro Ser Ser Tyr Leu Leu		
230	235	240
Asn Pro Gln Ser Glu Arg Ala Arg Tyr Ser Ser Asn Thr Asp Lys		
245	250	255
Glu Met Leu Val Leu Lys Leu Val Asp Leu Asn Gly Glu Asp Leu		
260	265	270
Gly Leu Ile Ser Trp Phe Ala Ile His Pro Val Ser Met Asn Asn		
275	280	285
Ser Asn His Phe Val Asn Ser Asp Asn Met Gly Tyr Ala Ala Tyr		
290	295	300
Leu Phe Glu Gln Glu Lys Asn Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Gly		
305	310	315
Pro Phe Val Ala Gly Phe Ala Ser Ser Asn Leu Gly Asp Val Ser		
320	325	330

Pro Asn Ile Leu Gly Pro His Cys Val Asn Thr Gly Glu Ser Cys

335 340 345

Asp Asn Asp Lys Ser Thr Cys Pro Asn Gly Gly Pro Ser Met Cys

350 355 360

Met Ala Ser Gly Pro Gly Gln Asp Met Phe Glu Ser Thr His Ile

365 370 375

Ile Gly Arg Ile Ile Tyr Gln Lys Ala Lys Glu Leu Tyr Ala Ser

380 385 390

Ala Ser Gln Glu Val Thr Gly Pro Val Leu Ala Ala His Gln Trp

395 400 405

Val Asn Met Thr Asp Val Ser Val Gln Leu Asn Ala Thr His Thr

410 415 420

Val Lys Thr Cys Lys Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Phe Ala Ala Gly

425 430 435

Thr Ile Asp Gly Val Ser Gly Leu Asn Ile Thr Gln Gly Thr Thr

440 445 450

Glu Gly Asp Pro Phe Trp Asp Thr Leu Arg Asp Gln Leu Leu Gly

455 460 465

Lys Pro Ser Glu Glu Ile Val Glu Cys Gln Lys Pro Lys Pro Ile

470 475 480

Leu Leu His Ser Gly Glu Leu Thr Ile Pro His Pro Trp Gln Pro

485 490 495

~~Asp Ile Val Asp Val Gln Ile Val Thr Val Gly Ser Leu Ala Ile~~

~~500 505 510~~

Ala Ala Ile Pro Gly Glu Leu Thr Thr Met Ser Gly Arg Arg Phe

515 520 525

Arg Glu Ala Ile Lys Lys Glu Phe Ala Leu Tyr Gly Met Lys Asp

530 535 540

Met Thr Val Val Ile Ala Gly Leu Ser Asn Val Tyr Thr His Tyr

545	550	555
Ile Thr Thr Tyr Glu Glu Tyr Gln Ala Gln Arg Tyr Glu Ala Ala		
560	565	570
Ser Thr Ile Tyr Gly Pro His Thr Leu Ser Ala Tyr Ile Gln Leu		
575	580	585
Phe Arg Asp Leu Ala Lys Ala Ile Ala Thr Asp Thr Val Ala Asn		
590	595	600
Met Ser Ser Gly Pro Glu Pro Pro Phe Phe Lys Asn Leu Ile Ala		
605	610	615
Ser Leu Ile Pro Asn Ile Ala Asp Arg Ala Pro Ile Gly Lys His		
620	625	630
Phe Gly Asp Val Leu Gln Pro Ala Lys Pro Glu Tyr Arg Val Gly		
635	640	645
Glu Val Val Glu Val Ile Phe Val Gly Ala Asn Pro Lys Asn Ser		
650	655	660
Ala Glu Asn Gln Thr His Gln Thr Phe Leu Thr Val Glu Lys Tyr		
665	670	675
Glu Asp Ser Val Ala Asp Trp Gln Ile Met Tyr Asn Asp Ala Ser		
680	685	690
Trp Glu Thr Arg Phe Tyr Trp His Lys Gly Ile Leu Gly Leu Ser		
695	700	705
Asn Ala Thr Ile Tyr Trp His Ile Pro Asp Thr Ala Tyr Pro Gly		
710	715	720
Ile Tyr Arg Ile Arg Tyr Phe Gly His Asn Arg Lys Gln Glu Leu		
725	730	735
Leu Lys Pro Ala Val Ile Leu Ala Phe Glu Gly Ile Ser Ser Pro		
740	745	750
Phe Glu Val Val Thr Thr		
755		

<210> 14

<211> 682

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 14

Phe Ser Gly Tyr Tyr Ile Gly Val Gly Arg Ala Asp Cys Thr Gly			
1	5	10	15
Gln Val Ser Asp Ile Asn Leu Met Gly Tyr Gly Lys Asn Gly Gln			
	20	25	30
Asn Ala Arg Gly Leu Leu Thr Arg Leu Phe Ser Arg Ala Phe Ile			
	35	40	45
Leu Ala Asp Pro Asp Gly Ser Asn Arg Met Ala Phe Val Ser Val			
	50	55	60
Glu Leu Cys Met Ile Ser Gln Arg Leu Arg Leu Glu Val Leu Lys			
	65	70	75
Arg Leu Glu Ser Lys Tyr Gly Ser Leu Tyr Arg Arg Asp Asn Val			
	80	85	90
Ile Leu Ser Ala Ile His Thr His Ser Gly Pro Ala Gly Phe Phe			
	95	100	105
Gln Tyr Thr Leu Tyr Ile Leu Ala Ser Glu Gly Phe Ser Asn Arg			
	110	115	120
Thr Phe Gln Tyr Ile Val Ser Gly Ile Met Lys Ser Ile Asp Ile			
	125	130	135
Ala His Thr Asn Leu Lys Pro Gly Lys Ile Phe Ile Asn Lys Gly			
	140	145	150
Asn Val Ala Asn Val Gln Ile Asn Arg Ser Pro Ser Ser Tyr Leu			
	155	160	165

Leu Asn Pro Gln Ser Glu Arg Ala Arg Tyr Ser Ser Asn Thr Asp		
170	175	180
Lys Glu Met Leu Val Leu Lys Leu Val Asp Leu Asn Gly Glu Asp		
185	190	195
Leu Gly Leu Ile Ser Trp Phe Ala Ile His Pro Val Ser Met Asn		
200	205	210
Asn Ser Asn His Phe Val Asn Ser Asp Asn Met Gly Tyr Ala Ala		
215	220	225
Tyr Leu Phe Glu Gln Glu Lys Asn Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln		
230	235	240
Gly Pro Phe Val Ala Gly Phe Ala Ser Ser Asn Leu Gly Asp Val		
245	250	255
Ser Pro Asn Ile Leu Gly Pro His Cys Val Asn Thr Gly Glu Ser		
260	265	270
Cys Asp Asn Asp Lys Ser Thr Cys Pro Asn Gly Gly Pro Ser Met		
275	280	285
Cys Met Ala Ser Gly Pro Gly Gln Asp Met Phe Glu Ser Thr His		
290	295	300
Ile Ile Gly Arg Ile Ile Tyr Gln Lys Ala Lys Glu Leu Tyr Ala		
305	310	315
Ser Ala Ser Gln Glu Val Thr Gly Pro Val Leu Ala Ala His Gln		
320	325	330
<del>Trp Val Asn Met Thr Asp Val Ser Val Gln Leu Asn Ala Thr His</del>		
<del>335</del>	<del>340</del>	<del>345</del>
Thr Val Lys Thr Cys Lys Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Phe Ala Ala		
350	355	360
Gly Thr Ile Asp Gly Val Ser Gly Leu Asn Ile Thr Gln Gly Thr		
365	370	375
Thr Glu Gly Asp Pro Phe Trp Asp Thr Leu Arg Asp Gln Leu Leu		

380	385	390
Gly Lys Pro Ser Glu Glu Ile Val Glu Cys Gln Lys Pro Lys Pro		
395	400	405
Ile Leu Leu His Ser Gly Glu Leu Thr Ile Pro His Pro Trp Gln		
410	415	420
Pro Asp Ile Val Asp Val Gln Ile Val Thr Val Gly Ser Leu Ala		
425	430	435
Ile Ala Ala Ile Pro Gly Glu Leu Thr Thr Met Ser Gly Arg Arg		
440	445	450
Phe Arg Glu Ala Ile Lys Lys Glu Phe Ala Leu Tyr Gly Met Lys		
455	460	465
Asp Met Thr Val Val Ile Ala Gly Leu Ser Asn Val Tyr Thr His		
470	475	480
Tyr Ile Thr Thr Tyr Glu Glu Tyr Gln Ala Gln Arg Tyr Glu Ala		
485	490	495
Ala Ser Thr Ile Tyr Gly Pro His Thr Leu Ser Ala Tyr Ile Gln		
500	505	510
Leu Phe Arg Asp Leu Ala Lys Ala Ile Ala Thr Asp Thr Val Ala		
515	520	525
Asn Met Ser Ser Gly Pro Glu Pro Pro Phe Phe Lys Asn Leu Ile		
530	535	540
Ala Ser Leu Ile Pro Asn Ile Ala Asp Arg Ala Pro Ile Gly Lys		
545	550	555
His Phe Gly Asp Val Leu Gln Pro Ala Lys Pro Glu Tyr Arg Val		
560	565	570
Gly Glu Val Val Glu Val Ile Phe Val Gly Ala Asn Pro Lys Asn		
575	580	585
Ser Ala Glu Asn Gln Thr His Gln Thr Phe Leu Thr Val Glu Lys		
590	595	600

Tyr Glu Asp Ser Val Ala Asp Trp Gln Ile Met Tyr Asn Asp Ala  
605 610 615  
Ser Trp Glu Thr Arg Phe Tyr Trp His Lys Gly Ile Leu Gly Leu  
620 625 630  
Ser Asn Ala Thr Ile Tyr Trp His Ile Pro Asp Thr Ala Tyr Pro  
635 640 645  
Gly Ile Tyr Arg Ile Arg Tyr Phe Gly His Asn Arg Lys Gln Glu  
650 655 660  
Leu Leu Lys Pro Ala Val Ile Leu Ala Phe Glu Gly Ile Ser Ser  
665 670 675  
Pro Phe Glu Val Val Thr Thr  
680

<210> 15

<211> 2049

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 15

ttcagtggct actacattgg cgttgggaga gcggattgca caggacaagt gtcagatata	60
aatttgatgg gctatggcaa aaatggccag aatgcacggg gtctcctcac caggctgttc	120
agccgtgctt ttatcttggc ggatccagat gggatcaaatac gaatggcatt tgtgagcgtg	180
gaactatgta tgatttccca acgactgagg ttggagggtcc tgaagagact agagagtaaa	240
tatggctctc tgtatcgaag agacaatggt atcctgagtg ccattcacac acactctggc	300
ccagcagggt ttttccaata tacactctat atactcgcca gcgagggatt cagcaaccgg	360
acctttcagt acatagtctc tgggatcatg aagagcattg atatagctca cacaaatctt	420
aaaccaggca aaatctttat caacaaagga aatgttgcta atgtgcagat caaccgaagc	480
ccctcctctt accttctgaa tccacagtca gagagagcaa ggtattcttc aaacacagac	540
aaggaaatgc tggctctgaa actggtggat ttgaatggag aagacttggg tcttatcagc	600



tggtttgcc	tccaccccgt	gagcatgaac	aatagcaacc	actttgtgaa	tagtgacaat	660
atgggctatg	cggttacct	ttttgagcaa	gaaaagaaca	aaggctatct	gcctggacag	720
ggaccgtttg	tagcaggctt	tgcttcatca	aatctcggag	acgtgtcacc	caacattctt	780
ggccccgatt	gigtcaacac	aggggagctt	tgtgacaacg	acaagagcac	ctgtcccaac	840
ggtgggccta	gcatgtgcat	ggccagcgga	cctggacaag	acatgtttga	gagcacacac	900
attataggac	ggatcatcta	tcagaaggcc	aaggagctgt	atgcctctgc	ctcccaggag	960
gtgaccggcc	cagtgtttgc	agctcaccag	tgggtgaaca	tgacagatgt	gagcgtccag	1020
ctcaatgcc	cacacacagt	gaagacgtgt	aaacctgccc	tgggctacag	ttttgccgca	1080
ggcacaattg	atggagtttc	gggcctcaat	attacacagg	gaactacgga	aggggatcca	1140
ttctgggaca	ctcttcggga	ccagctcttg	ggaaaaccaa	ctgaagagat	tgtagagtgt	1200
cagaaacca	aaccaatcct	gcttcacagt	ggagagctga	cgataccaca	tccttggcaa	1260
ccagatattg	ttgatgttca	gattgttacc	gttgggtcct	tggccatagc	tgctatccct	1320
ggggaattaa	caaccatgtc	gggacgaaga	tttcgtgagg	caattaaaaa	agaatttgca	1380
ctttatggga	tgaaggatat	gaccgttggt	atcgcaggtc	taagcaatgt	ttatacacat	1440
tacattacca	catatgaaga	ataccaggct	cagcggtagc	aggcagcatc	tacaatctat	1500
ggaccacaca	ccctgtctgc	atacatccaa	ctcttcagag	accttgctaa	ggcaattgct	1620
acggacacag	tagccaacat	gagcagtggt	cccgagcctc	catcttcaa	aaatctaata	1620
gcttcactta	ttcctaatat	tgcggataga	gcaccaattg	gcaaacattt	tggggatgtc	1680
ttgcagccag	caaaacctga	atacagagtg	ggagaagtgg	ttgaagttaa	attttaggtc	1740
gctaacccaa	agaattcagc	agagaaccag	acctatcaaa	ctttcctcac	tgtggagaaa	1800
tacgaggact	ctgtagctga	ctggcagata	atgtataacg	atgcctcctg	ggagacgagg	1860
ttttattggc	acaaaggaat	actgggtctg	agcaatgcaa	caatatactg	gcatattcca	1920
gatactgcct	accctggaat	ctacagaata	agatattttg	gacacaatcg	gaagcaggaa	1980
cttctgaaac	ccgtgtcat	actagcattt	gaaggaattt	cttctccttt	tgaagttgtc	2040
actacttag						2049

【図面の簡単な説明】

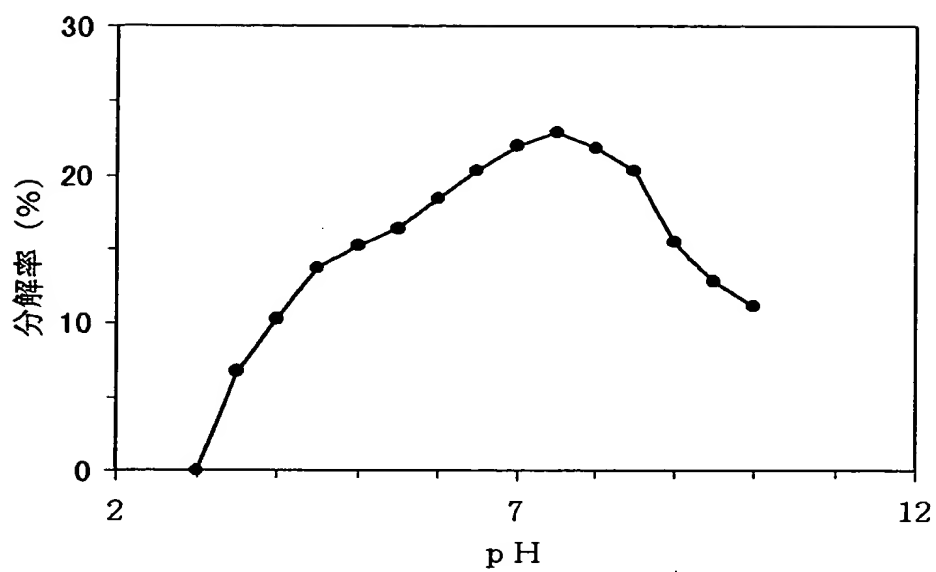
【図 1】 セラミダーゼの至適 pH を示す図である。

【図 2】 セラミダーゼ遺伝子を含む DNA 断片の制限酵素地図を示す図である。

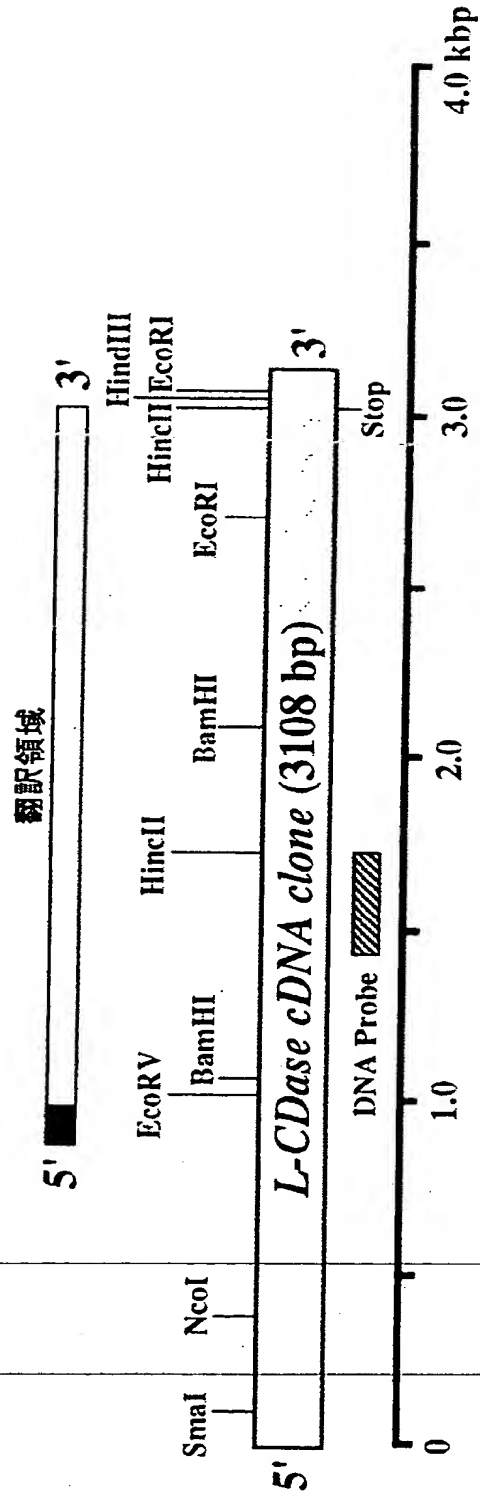
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

セラミダーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を用いたセラミダーゼの製造方法、該遺伝子を検出する方法、ならびにセラミダーゼ活性を有するポリペプチドの検出方法を提供すること。

【解決手段】

配列表の配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、もしくは該配列において、1 個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが導入されたアミノ酸配列からなり、かつ、セラミダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を導入された形質転換体ならびにそれを使用するセラミダーゼの製造方法、該遺伝子にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマー、ならびにそれを用いるセラミダーゼ遺伝子の検出方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

氏 名 寶酒造株式会社

